

鲜猪肉中水分含量快速测定 低场核磁共振法

Rapid detection of moisture content in fresh pork:
the low-field NMR method

2021- 02 - 03 发布

2021- 02 - 03 实施

前 言

本文件按照 GB/T1.1-2020 给出的规定起草。

本文件由南京农业大学提出。

本文件由中国畜产品加工研究会归口。

本文件起草单位：南京农业大学、苏州纽迈分析仪器股份有限公司、中国农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所、渤海大学、苏州市职业大学、河南省产品质量监督检验院。

本文件起草人：李春保、周光宏、杨培强、朱莹莹、汤晓艳、刘登勇、魏法山、徐幸莲、韩敏义、崔智勇、赵迪、粘颖群。

本标准为首次发布。

使用本标准应征得发布单位同意。

鲜猪肉中水分含量快速测定 低场核磁共振法

1 范围

本文件规定了基于低场核磁共振（LF-NMR, low-field nuclear magnetic resonance）技术对鲜猪肉水分含量快速测定方法的技术要求。

本文件规定的测试方法适用于鲜猪肉水分的快速检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB5009.3 食品安全国家标准 食品中水分的测定

3 工作原理

将待测肉样放入均匀静态磁场中，采用特定的核磁脉冲序列对样品中的水分进行激发，样品吸收激发能量后产生核磁共振信号，该信号与样品中的水分质量成正比，通过水分质量与接收信号幅值的线性关系曲线得到所测肉样的水分含量。

4 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件

4.1 低场核磁共振 Low-field nuclear magnetic resonance (LF-NMR)

采用永磁体产生静态主磁场，场强在1.0T 条件下，通过具有固定磁距的原子核（如 ^1H 质子）的特定频率的射频脉冲激发所发生吸收射频能量的现象，可作为鉴别不同物质的物理属性的一种方法。

4.2 横向弛豫时间 Transverse relaxation time (T_2)

静磁场中自旋的原子核从激发状态恢复到平衡状态的过程称为弛豫过程，弛豫过程所需的时间称为弛豫时间，当横向磁化矢量递减到最大值的37%时的时间称为横向弛豫时间（又称为自旋-自旋弛豫时间）。

4.3 水分分布 Moisture distribution

肉样中核磁共振横向弛豫时间所代表的水分分布状态，包括结合水、不易流动水和自由水。

4.4 结合水 Bound water

肉样中与蛋白质紧密结合的水，主要依靠氢键与蛋白质的极性基团相结合，其横向弛豫时间小于不易流动水和自由水。

4.5 不易流动水 Immobilized water

肉样中被细胞内胶体颗粒或者大分子吸附或存在于大分子结构空间、不能自由移动的水，其横向弛豫时间介于结合水和自由水之间。

4.6 自由水 Free water

肉样中存在于细胞内外，靠毛细管力保持，可不受阻碍地自由移动的水，其横向弛豫时间大于不易流动水和结合水。

5 测定步骤

5.1 待测肉样的制备

5.1.1 材料和设备

待测肉样应为鲜猪肉，肉样温度不低于0℃，不高于37℃。

双片刀（间距1.0 cm）、陶瓷刀。

核磁管（内径25 mm）。

5.1.2 仪器设备

天平（精度0.001g）

低场核磁共振仪：要求通用低场核磁共振分析仪，仪器样品仓的口径大于25mm，仪器内环境温度≤35℃。

5.1.3 制样方法

剔除肉眼可见的皮、筋膜、脂肪，用刀修整肉块边沿，并找出肌纤维的自然走向，用双片刀沿肌纤维的自然走向分切成多个1 cm厚的小块，再用陶瓷刀从1 cm厚的肉块中切成大小为1 cm×1 cm×2 cm的肉柱，每个肉样至少制备3个肉柱。在肉样的切取过程中应避免肉眼可见的结缔组织、血管以及其他缺陷。

5.2 低场核磁共振检测

5.2.1 校正参数及测定参数设置

选择国内外核磁共振测试领域已被普遍认可的"自由感应衰减-FID (Free Induction Decay) 序列, 和"CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) 序列", 从"肉品水分核磁测试序列参数库"中选取适当的参数作为校正参数及测定参数, 这些参数包括: 接收机带宽、质子共振频率、开始采样时间、等待时间、采样点数、模拟增益、数字增益、前置放大增益累加次数、数据半径、回波时间、回波个数、等待时间。

例:

MesoMR23型低场核磁分析仪, 配有25 mm直径线圈。

校正参数设置: 选择FID序列, 接收机带宽SW=100 kHz, 质子共振频率SF=21 MHz, 开始采样时间RFD=0.08 ms, 等待时间TW=2000 ms, 模拟增益RG1=20 db, 数字增益DRG1=3, 前置放大增益PRG=1, 累加次数NS=2。

测定参数设置: 选择CPMG序列, 接收机带宽SW=100 kHz, 质子共振频率SF=21 MHz, 开始采样时间RFD=0.08 ms, 等待时间TW=4000~8000 ms, 模拟增益RG1=20 db, 采样点数TD=1024, 数字增益DRG1=3, 前置放大增益PRG=2, 累加次数NS=8, DR=1, TE=0.3 ms, 回波次数NECH=2000~5000。

5.2.2 标准样品测定及标准曲线建立

将标准冻干肉样放入专用试管中，并放入核磁仪器的样品仓中进行基底数据采集；然后分别按照质量比1%、5%、10%、30%、50%、70%的比例添加水分（每个组别不少于5个重复），封口后在室温下静置30分钟，使肉样充分吸水，再放入仪器样仓中进行数据采集（附录A），建立标准曲线。

5.2.3 待测样品测定

将处理好的待测样品放入专用试管中，放入核磁仪器的样品仓中进行数据采集，得到待测样品水分的核磁信号。

5.3 数据处理和水分含量计算

5.3.1 数据处理

将测量的核磁信号按照X为采样时间（ms），Y为信号强度进行排列，得到样品连续分布的弛豫衰减曲线（CPMG曲线）的 T_2 弛豫反演图谱，按照谱峰的横向弛豫时间，可分为：

- $T_{2b}=1\sim 10\text{ ms}$ 为结合水；
- $T_{2f}=10\sim 100\text{ ms}$ 为不易流动水；
- $T_{2g}\geq 100\text{ ms}$ 为自由水。

根据水对应的反演图谱，分别计算出相应的核磁信号，其中包括： A_{2b} （结合水峰面积）、 A_{2f} （不易流动水峰面积）和 A_{2g} （自由水峰面积）。

5.3.2 标准曲线拟合

按照5.2.1中参数设置进行标准样品测试，实际添加水分质量分别记为（ M_1 、 M_2 ... M_n ），记录 S_1 、 S_2 ... S_n 分别为N个标准样品中三种水分（结合水、不易流动水和自由水）的反演峰面积之和，建立水分质量和核磁信号强度（峰面积之和）的线性模型如下：

$$Y=K*X+B \quad (1)$$

其中X为水分质量（g），K为拟合斜率，B为拟合截距；Y为样品反演图谱中的核磁信号强度（峰面积之和）。

5.3.3 结果计算

取待测肉样，其质量记录为 M_t ，按照5.3.2 中标准样品相同的参数和流程进行测试，得到样品 T_2 弛豫信号强度（反演图谱的面积之和），并记录为 S_t ，则待测肉样中的水分含量 C_t 计算如下：

$$C_t = \frac{(S_t - B)}{K * M_t} \times 100\% \quad (2)$$

其中：K为拟合斜率，B为拟合截距， M_t 为待测肉样的质量（g）， S_t 为待测肉样 T_2 弛豫反演图谱的面积之和， C_t 为待测肉样中的水分含量（%）。

肉样水分质量 $X(g)$ 按下列公式计算：

$$X(g) = (S_t - B') / K' \quad (3)$$

式中： S_t 为待测肉样 T_2 弛豫反演图谱的面积之和， B' 和 K' 为标准样品通过低场核磁共振测定与干燥法测定后，获得的结果经拟合后得到的参数校正参考值。

5.3.4 数据修约

实验结果按GB / T8170规定修约至小数点后两位。

附录A
(规范性附录)
标样制备和标准曲线制备

A.1 标准肉样制备

A.1.1 取新鲜的猪半膜肌，剔除肉眼可见的皮、筋膜、脂肪，用刀修整肉块边沿，并找出肌纤维的自然走向，用双片刀（间距1 cm）沿肌纤维的自然走向分切成多个1 cm厚的小块，再用陶瓷刀从1 cm厚的肉块中切成大小为1 cm×1 cm×2 cm的肉柱，每批次不少100个。在肉样的切取过程中应避免肉眼可见的结缔组织、血管以及其他缺陷。称取每个肉块的质量。

A.1.2 将制备好的肉柱在-18℃下冻结24小时，再转入冷冻干燥机中进行冷冻干燥，干燥时间不少于48小时，直至样品质量恒定。

A.1.3 将冷冻干燥后的标准样品放在密闭干燥的容器中，置于常温避光保存，保存时间不超过1年。

A.2 标准曲线制备

A.2.1 取冷冻干燥的标准样品（不少于5份），称其质量，记为 m_1 、 m_2 、 m_3 、 m_4 、 m_5 、……、 m_n 。之后按照下列方法添加水分，获得不同比例的水分含量。

水分含量	标准肉样质量 (g)	水分添加量 X_1 (g)	水分添加量 X_2 (g)	水分添加量 X_3 (g)	水分添加量 X_4 (g)	水分添加量 X_5 (g)	水分添加量 X_6 (g)
0%	m_n	0					
1%	m_n	$X_1=m_n/99$					
5%	m_n		$X_2=m_n/19$				
10%	m_n			$X_3=m_n/9$			
30%	m_n				$X_4=3m_n/7$		
50%	m_n					$X_5=m_n$	
70%	m_n						$X_6=7m_n/3$

A.2.2 水分添加方法，先将冻干样品放入核磁共振专用试管中，之后用1mL移液器吸取上表中列出的需要添加的水分量，并在室温下静置半小时以上，使肉样充分吸水，再放入仪器样仓中进行数据采集。同一个样品可依次多次添加水分，以获得不同水分含量；水分添加量按由低到高顺序进行。

A.2.3 选择国内外核磁共振测试领域已被普遍认可的“自由感应衰减-FID (Free Induction Decay) 序列，和“CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) 序列”，从“肉品水分核磁测试序列参数库”中选取适当的参数作为校正参数及测定参数，这些参数包括接收机带宽、质子共振频率、开始采样时间、等待时间、采样点数、模拟增益、数字增益、前置放大增益累加次数、数据半径、回波时间、回波个数、等待时间。

A.2.4 将测量结果按照横坐标为采样时间（ms），纵坐标为回波强度，得到样品连续分布弛豫衰减曲线图（CPMG曲线）。利用CPMG采样曲线进行反演拟合得T2弛豫反演图谱，按照反演图谱所在峰的时间区间， $t_{2b}=1\sim 10\text{ ms}$ 为结合水， $t_{21}=10\sim 100\text{ ms}$ 为不易流动水， $t_{22}\geq 100\text{ ms}$ 为自由水，计算出 A_{2b} （结合水对应的反演峰面积）、 A_{21} （不易流动水对应的反演峰面积）和 A_{22} （自由水对应的反演峰面积）。将峰面积进行加和 $S_n=A_{2b}+A_{21}+A_{22}$ 。

A.2.5 以添加水分质量 X 为自变量，以峰面积之和 Y 为因变量，得到回归模型：

$$Y=K*X+B$$

其中 X 为水分质量（g）， K 为拟合斜率， B 为拟合截距， Y 为样品反演图谱中的峰面积之和。